



UNIWERSYTET
WARSZAWSKI

Wydział Chemii



Warszawa, 26.03.2023r.

dr hab. Dorota Matyszewska
Wydział Chemii,
Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski
ul. Żwirki i Wigury 101
02-089 Warszawa

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Martyny Krajewskiej

„Biomimetic systems studied by Langmuir and Langmuir-Blodgett techniques”

Recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Krajewskiej została przygotowana w Zakładzie Technologii Chemicznej Wydziału Technologii Chemicznej Politechniki Poznańskiej pod kierunkiem prof. dr hab. Krystyny Prochaskiej oraz dr Katarzyny Dopierały. Celem pracy było scharakteryzowanie systemów biomimetycznych o potencjale terapeutycznym. Doktorantka skupiła się na kompleksach kwasów tłuszczowych z białkiem, układach triterpen-białko oraz warstwach mieszanych kwasu triterpenowego i kwasu tłuszczowego w kontekście ich zastosowania jako nośników leków. Z pewnością podjęta tematyka jest istotna z punktu widzenia rozwoju badań w zakresie nowych potencjalnych leków i ich nośników. Dokładniejsze poznanie mechanizmów oddziaływania tego typu układów, jak również określenie czynników wpływających na tworzenie się i trwałość kompleksów kwasów tłuszczowych z białkami może dostarczyć istotnych informacji przydatnych zarówno do dokładniejszego opisu aktywnych związków farmaceutycznych, jak i do projektowania nowoczesnych systemów dostarczania leków.

Rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Krajewskiej została napisana w języku angielskim i obejmuje opis zbioru 6 artykułów naukowych opublikowanych w latach 2019-2022 w renomowanych czasopismach naukowych takich jak: Langmuir, Journal of Molecular Liquids, oraz Journal of Physical Chemistry B o łącznym współczynniku IF powyżej 30. Tematyka prac związana jest z tworzeniem się kompleksów kwasu oleinowego oraz linoleinowego z α -laktoalbuminą (publikacje 1-4), oddziaływań kwasu oleanolowego z albuminą surowicy

ludzkiej (publikacja 5) oraz opisem warstw mieszanych składających się z kwasu oleinowego i oleanolowego. Opis artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej poprzedzony jest streszczeniem w języku angielskim i polskim. Następnie Autorka omawia najważniejsze zagadnienia związane z tematem rozprawy doktorskiej. W pierwszym rozdziale opisana jest w szerokim kontekście technika Langmuira będąca podstawową techniką wykorzystywaną w pracy. W ciekawy i przejrzysty sposób przedstawiono podstawy teoretyczne tej metody, a także jej wykorzystanie do badania substancji biologicznie czynnych. Rozdział ten jest napisany na podstawie ponad 80 publikacji, z reguły właściwie dobranych. Liczne czytelne rysunki i schematy w istotny sposób ułatwiają i uatrakcyjniają jego czytanie. Niemniej jednak rozdział ten nie jest pozbawiony pewnych drobnych błędów, które wymieniam z recenzenckiego obowiązku. W mojej opinii w części opisującej substancje amfifilowe przydatne byłoby umieszczenie wzorów substancji używanych w eksperymentach opisywanych dalej przez Doktorantkę. Brakuje także definicji ciśnienia powierzchniowego stanowiącego podstawę pomiaru w trakcie eksperymentu wykonywanego techniką Langmuira. Ponadto, rysunek 3 (str. 29) zgodnie z podpisem pokazuje izotermę kwasu oleinowego wskazując, iż tworzy on fazę stałą, co nie jest zgodne z danymi literaturowymi i maksymalnymi wartościami współczynnika ściśliwości podawanymi dalej. Jak się domyślam, Autorka miała zamiar ogólnie opisać zmiany w organizacji cząsteczek zachodzące w trakcie kompresji warstwy. W takiej sytuacji chyba lepiej posłużyć się teoretyczną izotermą pokazującą wszystkie możliwe fazy i przejścia fazowe. Poza tym w rozdziale tym Autorka skupia się jedynie na opisie metody Langmuira, całkowicie pomijając informacje o innych metodach pomiarowych zastosowanych do opisu badanych układów. Z pewnością pominięcie tych informacji podyktowane było chęcią zachowania odpowiedniej długości rozprawy. Wydaje mi się jednak, że ta część pracy zyskałaby jeszcze bardziej, gdyby Autorka umieściła w niej chociaż skrótowy opis innych technik wykorzystywanych w swojej pracy eksperymentalnej, podając jakiego rodzaju informacje na temat oddziaływań kwas-białko pozwalają one uzyskać.

Niemniej jednak, pomimo tych kilku wymienionych drobnych niedociągnięć, wstęp literaturowy stanowi bardzo dobre wprowadzenie do opisu przeprowadzonych eksperymentów,

które przedstawione są w rozdziałach 2, 3 i 4. Sam opis uzyskanych wyników poprzedzony jest krótkim rozdziałem prezentującym motywację i cel pracy. Doktorantka zakłada, że w ramach rozprawy zaprezentowana zostanie dokładna ilościowa i jakościowa charakterystyka układów biomimetycznych o potencjalnych właściwościach terapeutycznych oraz możliwość ich wykorzystania jako nowoczesnych produktów farmaceutycznych. Tak postawiony cel wydaje się nieco zbyt ogólny i co prawda koresponduje z tematem pracy ujętym również w sposób dosyć ogólny, ale nie oddaje w sposób wystarczający rzeczywistego i istotnego wkładu Doktorantki do wyjaśnienia mechanizmów i czynników decydujących o powstawaniu kompleksów typu HAMLET pomiędzy kwasami tłuszczowymi i α -laktoalbuminą, oddziaływań kwasu triterpenowego z albuminą surowicy ludzkiej oraz opisem warstw mieszanych kwas triterpenowy - kwas tłuszczowy. Zagadnienia te są szczegółowo i ciekawie opisane w trzech kolejnych rozdziałach rozprawy. Prace stanowiące ich podstawę zostały już opublikowane, a więc przeszły etap recenzji i spełniły wszelkie wymogi stawiane pracom naukowym w renomowanych czasopismach międzynarodowych, co znacząco ułatwia proces recenzji niniejszej rozprawy. W związku z tym pozwolę sobie jedynie bardzo skrótowo wymienić najważniejsze w mojej opinii osiągnięcia Doktorantki, do których należą:

- ✓ Określenie wpływu czynników takich jak temperatura, pH oraz obecność jonów wapnia na efektywność tworzenia kompleksów typu HAMLET pomiędzy kwasami tłuszczowymi i α -laktoalbuminą oraz określenie mechanizmów odpowiadających za oddziaływanie pomiędzy tymi dwoma składnikami
- ✓ Potwierdzenie wpływu stopnia organizacji i upakowania cząsteczek kwasów tworzących monowarstwę na możliwość penetracji warstwy przez białko, a także wykazanie, że wzrost stężenia białka w subfazie powoduje wzrost penetracji warstwy tylko do pewnego stężenia granicznego, powyżej którego nie jest już obserwowany dalszy wzrost oddziaływania białka z monowarstwą kwasu
- ✓ Pokazanie różnic w mechanizmach tworzenia się kompleksów HAMLET w zależności od zastosowanego kwasu tłuszczowego

- ✓ Uzyskanie dokładniejszych informacji na temat kinetyki tworzenia się takich kompleksów i opis kolejnych etapów tego procesu
- ✓ Podjęcie próby dokładniejszego wyjaśnienia procesu wbudowywania się albuminy surowicy ludzkiej w warstwy bolaamfifilowego kwasu oleanolowego, stanowiącego w moim odczuciu układ bardziej skomplikowany niż wcześniej opisywane kompleksy typu HAMLET tworzące się pomiędzy kwasami tłuszczowymi i α -laktoalbuminą
- ✓ Fizykochemiczny opis właściwości warstw mieszanych kwasu triterpenowego i kwasu tłuszczowego tworzonych na granicy faz woda-powietrze w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako nośników leków zwiększających rozpuszczalność terpenoidów.

Uzyskane mgr inż. Martynę Krajewską wyniki są przedstawione w niniejszej rozprawie w sposób logiczny, a ich dyskusja jest merytorycznie poprawna i dokładna. W trakcie czytania rozprawy, oprócz bardziej szczegółowych uwag dotyczących wstępu teoretycznego wskazanych powyżej, nasunęło mi się także kilka komentarzy i wątpliwości o charakterze bardziej ogólnym dotyczących zaprezentowanych wyników. Uwagi te w żaden sposób nie umniejszają mojej jak najbardziej pozytywnej oceny pracy, ale mam nadzieję, że będą podstawą do ciekawej dyskusji w trakcie publicznej obrony:

1. W publikacji 1 szczegółowo dyskutowany jest wpływ zmiany pH subfazy na tworzenie kompleksów typu HAMLET pomiędzy kwasem oleinowym oraz α -laktoalbuminą. Wpływ ten jest w sposób ewidentny widoczny na podstawie porównania izoterm rejestrowanych dla różnych wartości pH subfazy. Czy zmiana pH wpływa również na zmiany wartości współczynnika ściśliwości uzyskanego zarówno dla monowarstwy kwasu, jak i kwasu w obecności α -laktoalbuminy?
2. W ostatnim rozdziale podsumowującym Doktorantka słusznie stwierdza, że pomiary wykonywane metodą Langmuira z zastosowaniem wyższej temperatury subfazy są problematyczne. Czy problem odparowania subfazy był uwzględniany w badaniach przedstawianych w niniejszej rozprawie, zwłaszcza w przypadku pomiarów zmian

powierzchni przy stałym ciśnieniu, prowadzonych w dłuższych odcinkach czasowych w temperaturze 36.6°?

3. W opisie publikacji 5 na stronie 85 Autorka podsumowuje wyniki i wnioski płynące z obrazowania za pomocą AFM warstw kwasu oleanolowego, albuminy surowicy ludzkiej oraz warstw kwasu w obecności albuminy przeniesionych na podłoże stałe. Opis ten ze zrozumiałych względów jest dosyć skrótowy, niemniej jednak brak pewnych nieco bardziej szczegółowych informacji powoduje pewne wątpliwości. Czy HSA faktycznie tworzy samodzielnie stabilne warstwy na granicy faz woda-powietrze? Można tak przypuszczać na podstawie informacji o przeniesieniu takich warstw przy ciśnieniu 10 mN/m na podłoże stałe i obrazowaniu ich za pomocą AFM (rys. P5.4). Jeśli tak faktycznie jest, to jak wygląda izoterma dla monowarstwy HSA? Czy w takim razie eksperymenty wykorzystujące po prostu tworzenie warstw mieszanych tych dwóch składników (a nie adsorpcja albuminy w czasie do wcześniej utworzonej monowarstwy kwasu) nie wydają się lepszym rozwiązaniem pod kątem efektywności tworzenia kompleksów OLA/HSA w celu zastosowania jako nośniki leków? Ponadto, jakiego rodzaju substrat używano do przenoszenia warstw za pomocą metody LB, a jakiego za pomocą metody LS? Czy brano pod uwagę jego hydrofilowość/hydrofobowość w dyskusji właściwości otrzymanych warstw na podłożu stałym? Właściwości samego podłoża są przecież bardzo istotne jeśli chodzi o dobór metody przenoszenia warstw i ich finalną architekturę.

Reasumując, na podstawie załączonych prac i ich syntetycznego opisu można stwierdzić, że wyniki ujęte w ramach niniejszej rozprawy bezsprzecznie stanowią wartościowy wkład do szeroko pojętej dziedziny naukowej związanej z poszukiwaniami nowych, efektywnych substancji terapeutycznych. Zaprezentowane rezultaty umożliwiają głębsze zrozumienie czynników wpływających na tworzenie się kompleksów kwasów tłuszczowych i białek z grupy albumin, a także możliwości tworzenia kompleksów triterpenów z białkami lub kwasami tłuszczowymi w celu poprawy ich rozpuszczalności i potencjalnego zastosowania jako nośników leków. Ocena wkładu Doktorantki w prezentowane badania również nie pozostawia

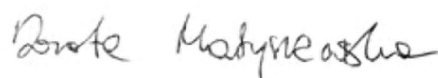
żadnych wątpliwości. Niniejsza rozprawa została przygotowana na podstawie 6 opublikowanych prac wieloautorskich, z czego w czterech z nich mgr inż. Martyna Krajewska jest pierwszym autorem. Sugeruje to Jej znaczący wkład zarówno w część eksperymentalną, jak i w powstanie samych manuskryptów. Na podstawie analizy oświadczeń współautorów można stwierdzić, że Doktorantka samodzielnie wykonywała przeważającą część eksperymentów, a pozostali współautorzy odpowiedzialni byli np. za przeprowadzenie i opis eksperymentów z wykorzystaniem techniki AFM. Można więc z całą pewnością stwierdzić, że zakres badań prowadzonych osobiście przez mgr inż. Martynę Krajewską jest w zupełności wystarczający jako podstawa do uzyskania stopnia naukowego doktora.

Na szczególną uwagę zasługuje z pewnością również fakt, że rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Krajewskiej jest wyjątkowo starannie przygotowana pod względem edycyjnym. Konsekwentnie zachowana spójność w formacie rysunków i schematów, czytelny podział pracy na podrozdziały, wyraźne oznaczenie wykresów zaczerpniętych z opisywanych publikacji bardzo ułatwiają jej odbiór. Ponadto, rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym. W zasadzie brak jest błędów językowych i literowych, co tym bardziej należy podkreślić biorąc pod uwagę to, że jest ona napisana w języku angielskim.

Podsumowując całościowo dorobek naukowy mgr inż. Martyny Krajewskiej warto również zauważyć, że Doktorantka jest współautorką w sumie aż trzynastu publikacji naukowych w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu i wysokich współczynnikach IF. Jej prace były do tej pory cytowane w sumie 46 razy, co dodatkowo potwierdza aktualność prowadzonych przez Nią badań. Warto też zaznaczyć, że Doktorantka oprócz działalności publikacyjnej i uczestnictwa w konferencjach jest kierownikiem w projekcie badawczym PRELUDIUM finansowanym przez NCN, a także odbyła kilkumiesięczny staż w USA w ramach stypendium Fundacji Kościuszkowskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Martyny Krajewskiej spełnia wszystkie wymogi zwyczajowe i formalne stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z ustawą z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). W związku

z tym wnoszę o dopuszczenie mgr inż. **Martyny Krajewskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie Jej stopnia doktora nauk chemicznych.** Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność tematyki podjętej w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej, jej wysoki poziom naukowy poparty licznymi publikacjami w renomowanych czasopismach, a także całościowy dorobek publikacyjny Doktorantki oraz jej aktywność naukową **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**



dr hab. Dorota Matyszewska